

Socket No.: 1259-001

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
PATENT OPERATIONS

In re Application of: )  
)  
**Bojidar Stankov** ) Group Art Unit: --  
)  
Serial No.: 09/854,802 ) Examiner: --  
)  
Filed: May 14, 2001 )

For: **CONTROLLED RELEASE FORMULATIONS CONTAINING AN ACTIVE  
INGREDIENT, PREFERABLY MELATONIN, AND THE METHOD OF  
PREPARATION**

New York, NY 10036  
August 17, 2004

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

**CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119**

SIR:

In the matter of the above-identified application and under the provisions of 35  
U.S.C. §119 Inventor(s) claim the benefit of the following prior applications:

Application(s) filed in : Italy  
In the name of Applicant(s) : **Bojidar Stankov**  
Application No(s). : MI 2000 A 001093  
Filed : May 17, 2000

Pursuant to the Claim to Priority, Applicant(s) submit duly certified copy of  
said foreign application.

Respectfully submitted,

James V. Costigan  
Registration No. 25,669

HEDMAN & COSTIGAN, P.C.  
1185 Avenue of the Americas  
New York, NY 10036-2646  
(212) 302-8989

I hereby certify that this correspondence is being  
deposited with the United States Postal Service  
as first class mail in an envelope addressed to:

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

on: August 17, 2004

James V. Costigan, Registration No. 25,669



# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

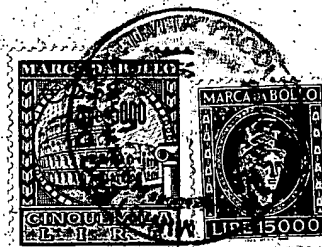
Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

N.

Invenzione Industriale

MI2000 A 001093

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*



Roma

21 DIC. 2001

IL DIRIGENTE

*Giorgio Romani*

Ing. Giorgio ROMANI

## AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO

## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione AMBROS PHARMA S.r.l.  
 Residenza MILANO codice 1235930125  
 2) Denominazione \_\_\_\_\_  
 Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dr. Diego Pallini ed altri cod. fiscale \_\_\_\_\_  
 denominazione studio di appartenenza Notarbartolo & Gervasi S.p.A.  
 via C.so di Porta Vittoria n. 9 città Milano cap 20122 (prov) MI

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

## D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) \_\_\_\_\_ gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Composizioni a rilascio controllato contenenti un principio attivo, preferibilmente melatonina, e processo di preparazione delle stesse.

## ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) Stankov Bojidar M. 3) \_\_\_\_\_  
 2) \_\_\_\_\_ 4) \_\_\_\_\_

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N° Protocollo

1) nessuna \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
 2) \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1)	<u>2</u>	<u>PROV</u>	n. pag. <u>25</u>	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)	_____
Doc. 2)	<u>2</u>	<u>PROV</u>	n. tav. <u>01</u>	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)	_____
Doc. 3)	<u>1</u>	<u>RIS</u>		lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale	_____
Doc. 4)	<u>0</u>	<u>RIS</u>		designazione inventore	_____
Doc. 5)	<u>0</u>	<u>RIS</u>		documenti di priorità con traduzione in italiano	_____
Doc. 6)	<u>0</u>	<u>RIS</u>		autorizzazione o atto di cessione	_____
Doc. 7)	<u>0</u>			nominativo completo del richiedente	_____

8) attestati di versamento, totale lire Cinquecentosessantacinquemila.= \_\_\_\_\_ obbligatorio

COMPILATO IL 17/05/2000

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Diego Pallini

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

MILANO

codice 15

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2000A 001093

Reg. A.

L'anno millenovecento

DUEMILA

il giorno

DICIASSETTE

del mese di

MAGGIO

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda corredata di \_\_\_\_\_

00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

## I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

Roberto Roberto



UFFICIALE ROGANTE

M. CORTONESI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

M2000 A 001093

REG. A

DATA DI DEPOSITO

17052000

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ / /

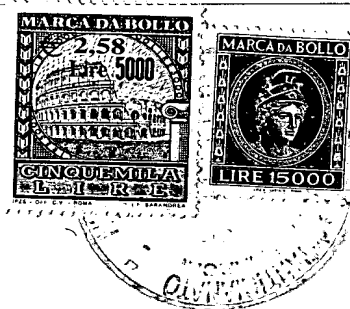
## D. TITOLO

Composizioni a rilascio controllato contenenti un principio attivo, preferibilmente melatonina, e processo di preparazione delle stesse.

## L. RIASSUNTO

La presente invenzione è relativa a delle nuove composizioni a rilascio controllato contenenti un principio attivo, preferibilmente melatonina, ed al processo di preparazione delle stesse. A seguito della somministrazione di tali composizioni, il principio attivo, preferibilmente melatonina, viene rilasciato secondo una modalità bifasica e, in particolare, in modo rapido nei primi minuti dalla sua somministrazione e in modo lento e prolungato nei tempi successivi. Le composizioni ottenute con tale processo possono essere utilmente impiegate nei casi di necessità di rilascio controllato dei principi attivi contenuti nella formulazione, ad esempio, nei disordini del ciclo sonno/veglia e di induzione del sonno, se contengono la melatonina.

## M. DISEGNO

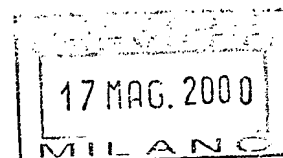


Descrizione della domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

Composizioni a rilascio controllato contenenti un principio attivo, preferibilmente melatonina, e processo di preparazione delle stesse a nome di: AMBROS PHARMA S.r.l.

con sede a : MILANO

inventore designato: Stankov Bojidar M.



\* \* \* \* \*

MI 2000A001093

### CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente invenzione è relativa a delle nuove composizioni a rilascio controllato contenenti melatonina, caratterizzate dal fatto che il principio attivo può essere rilasciato in un primo tempo in forma rapida ed in un secondo tempo in forma lenta e prolungata.

L'invenzione è relativa inoltre all'impiego di queste composizioni a rilascio controllato, come farmaci o integratori dietetico-alimentari o come alimenti, nel trattamento dei disturbi del sonno e ad un nuovo processo di preparazione di composizioni a rilascio controllato, contenenti in particolare melatonina.

### STATO DELLA TECNICA

La melatonina (N-acetil-5-metossitriptamina) è un composto indolico presente ampiamente in natura. E' prodotto in quasi tutti gli organismi viventi, dalle alghe all'uomo. Mentre negli organismi inferiori la melatonina potrebbe essere parte delle difese naturali contro lo stress ossidativo, è bene accertato che nei mammiferi e nell'uomo la melatonina è un Zeitgeber ("datore di tempo") secondario il quale, in sincronia con la luce (Zeitgeber primario), è in grado di sintonizzare l'orologio biologico endogeno con la

fotoperiodo prevalente.

In tal modo la melatonina governa i cicli diurni (circadiani) dell'organismo, mostrando un forte effetto sincronizzante del ritmo sonno-veglia. Per la sua spiccata attività sull'orologio circadiano la melatonina è stata impiegata per il trattamento delle sindromi legate alla desincronizzazione dei ritmi sonno-veglia dell'organismo, come ad esempio, il jet-lag, la sindrome della fase posticipata del sonno (DSPS), nelle persone non vedenti, negli anziani e nell'insonnia dei lavoratori a turni.

Oltre alla sua attività sul ciclo circadiano, la melatonina possiede anche effetti ipnotici che influiscono sia sull'induzione sia sulla profondità e la qualità del sonno. La melatonina è in grado di agire, infatti, in modo favorevole sulla microstruttura (*CAP* e *PAR rate*) del sonno *Non-REM*.

Il CAP (Cycling Alternating Pattern) è l'unico parametro obiettivo per accertare la qualità del sonno.

La melatonina è inoltre un forte regolatore della temperatura corporea e, poiché l'abbassamento della temperatura corporea è di estrema importanza per l'induzione e la qualità del sonno, questo dà un ulteriore contributo alla sua attività sul sonno.

Il rilascio notturno della melatonina in condizioni normali avviene con dei livelli superiori a 50-100 pg/ml e, durante il sonno fisiologico, ha una durata di circa 6-7 ore. L'inizio del rilascio in condizioni normali è comunque molto rapido e si raggiungono i massimi livelli fisiologici entro 30 minuti dall'inizio del rilascio della melatonina. Questo fenomeno ha imposto, negli studi dei suoi effetti sul sonno, la scelta dei vari dosaggi (0.1, 1, 10, 100 mg), scelta dettata d'altro canto dalla breve emivita della melatonina (20-40 minuti

nelle varie specie).

Di conseguenza l'impiego di bassi dosaggi (0.1, 1mg), che corrisponderebbero ai livelli "fisiologici" della melatonina nel sangue periferico, si sono rivelati scarsamente efficaci ai fini della regolazione del ciclo sonno/veglia e dell'induzione del sonno, in quanto, dopo la facilitazione della fase di induzione del sonno, il soggetto trattato mostra la tipica tendenza al risveglio, vale a dire ad elevati valori di WASO (Wake After Sleep Onset) sia come numero dei risvegli, sia come tempo di veglia trascorso dopo l'inizio del sonno.

La somministrazione dei dosaggi "farmacologici" è altrettanto da evitare, per motivi inerenti alla prolungata biodisponibilità della melatonina nel sangue periferico anche molte ore dopo il tempo del risveglio, quando i livelli fisiologici sono già molto bassi.

A tutto ciò si è cercato di ovviare con la somministrazione di melatonina in varie forme *retard* (orale, transcutanea, transmucosale). Lo svantaggio delle forme *retard* messe a punto fino ad oggi è però il lento assorbimento della melatonina, con la conseguenza del mancato effetto sull'induzione del sonno.

D'altro canto, le forme a rilascio controllato o pulsatile sviluppate fino ad oggi sono molto costose, essendo realizzabili in preparazioni costituite da più compresse collocate nella stessa capsula. Non sono inoltre adatte per la preparazione di prodotti dietetici, in quanto utilizzano ritardanti ed eccipienti che non sono ammessi nell'alimentazione e nell'integrazione alimentare, e che possono avere effetti indesiderati.

SOMMARIO

Ora noi abbiamo trovato, e costituisce oggetto della presente invenzione, delle nuove composizioni per il rilascio controllato della melatonina, in grado di "imitare" la condizione fisiologica di biodisponibilità della melatonina nel sangue periferico.

Le nuove composizioni, per la loro flessibilità, permettono la variazione dei parametri di cessione con la possibilità di ottenere un preciso *pattern* bifasico, simile a quello naturale osservato nell'organismo durante il periodo notturno di sintesi e di rilascio della melatonina endogena.

Queste nuove composizioni sono costituite da una singola compressa, in grado di rilasciare la melatonina in essa contenuta in maniera controllata, allo scopo di ottenere una cessione bifasica: prima un rilascio quasi immediato, dopo circa 5-10 minuti dalla somministrazione, di una percentuale prestabilita (ad esempio compresa fra il 25% e il 30% della dose complessiva) seguita da un rilascio ritardato della rimanente parte della melatonina contenuta nella compressa, con l'inizio del rilascio dopo circa 30-45 minuti dalla somministrazione, per una durata di 5-7 ore.

Sono quindi oggetto della presente invenzione delle nuove composizioni a rilascio controllato contenenti melatonina, caratterizzate dal fatto di essere costituite da un nucleo interno a rilascio lento, a durezza e contenuto di principio attivo predeterminato, e da una copertura esterna («corteccia») a rilascio veloce, contenente ulteriore dosaggio predeterminato di melatonina.

Il contenuto di melatonina può essere compreso fra 0,1 e 100 mg sia nel nucleo interno sia nella "corteccia" esterna, preferibilmente può essere compreso fra 2 e 3 mg nel nucleo interno e fra 0,5 e 1,5 mg nella "corteccia"





esterna.

Le composizioni della presente invenzione possono trovare una utile applicazione sia nel campo farmaceutico sia dietetico e/o alimentare, per la regolazione del ciclo sonno/veglia e nell'induzione del sonno.

È un ulteriore oggetto della presente invenzione un nuovo processo per la preparazione di composizioni a rilascio controllato, in particolare contenenti melatonina, caratterizzato dalla preparazione di un nucleo a durezza e contenuto di principio attivo, preferibilmente melatonina, predeterminati e dalla sovrapposizione di una copertura esterna («corteccia») contenente un ulteriore dosaggio predeterminato di principio attivo, preferibilmente melatonina.

Il processo per la preparazione di dette composizioni è caratterizzato dalle seguenti fasi:

- a) preparazione del nucleo a cessione ritardata contenente il principio attivo, preferibilmente melatonina;
- b) formazione della copertura esterna («corteccia») contenente un ulteriore dosaggio di principio attivo, preferibilmente melatonina, sotto controllo continuo;
- c) fissaggio della copertura esterna.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

È noto da tempo l'impiego di composizioni, soprattutto di tipo dietetico, contenenti melatonina per la regolazione del ciclo sonno/veglia e per l'induzione del sonno. Nonostante ciò, sino ad ora la somministrazione esogena di melatonina presenta ancora dei seri problemi, connessi con le modalità di azione tipiche di questo composto e con la sua breve emivita.

Allo scopo di ottenere un effetto "fisiologico" sarebbe infatti necessario rendere disponibili dei livelli endogeni di melatonina tali da indurre in modo rapido il sonno e successivamente dei livelli di ormone tali da prolungare la fase del sonno. Solo in questo modo infatti si può intervenire nel riequilibrio del ciclo sonno/veglia alterato a seguito di diverse cause fisiopatologiche.

Come già accennato in precedenza nessuna delle soluzioni fino ad oggi adottate ha risolto in modo soddisfacente a questo problema.

Inoltre, le composizioni a rilascio controllato, o pulsatile, non sono adatte per l'impiego come integratori dietetici o come alimenti, che è l'impiego di elezione non avendo la somministrazione di melatonina effetti collaterali di rilievo e non essendo la melatonina un farmaco, ma un composto naturale.

Allo scopo di risolvere i problemi fino ad oggi non risolti, il Richiedente ha trovato delle nuove composizioni a rilascio controllato per la somministrazione di melatonina e un nuovo e vantaggioso sistema per la preparazione di composizioni a rilascio controllato.

Le composizioni a rilascio controllato secondo la presente invenzione sono costituite da formulazioni in forma di un'unica compressa, caratterizzata da un nucleo centrale sul quale viene sovrapposta una copertura esterna («corteccia»), contenenti entrambi il principio attivo, a dosaggi predeterminati.

Per verificare la efficacia delle composizioni secondo l'invenzione, abbiamo svolto delle prove in cui i dosaggi della melatonina e gli eccipienti utilizzati sono stati determinati sulla base dei dati ottenuti in laboratorio con prove e studi sul ritmo della melatonina nell'uomo e di farmacocinetica della

melatonina nell'uomo.

Scopo dell'invenzione è quello di ottenere delle composizioni a rilascio controllato, nelle quali circa il 100% del principio attivo contenuto nella «corteccia» fosse rilasciato in un periodo compreso fra 5 e 10 minuti dalla somministrazione, e l'80-90% del principio attivo contenuto nel nucleo fosse rilasciato entro le quattro ore successive alla somministrazione.

Questa cinetica di rilascio bifasica corrisponde a dei picchi della concentrazione di melatonina, nel sangue periferico dell'uomo che si verificano dopo circa trenta minuti e circa centoventi minuti dalla somministrazione, con una biodisponibilità complessiva per circa 5-6 ore dopo la somministrazione.

Quindi, scopo particolare della presente invenzione è quello di mettere a disposizione delle nuove composizioni a rilascio controllato che permettono di ottenere dei livelli massimi di melatonina nell'uomo equivalenti a circa 1000-2000 pg/ml, che sono concentrazioni farmacologiche basse, adeguate per ottenere effetti rilevanti e significativi sul ritmo sonno-veglia, sull'induzione e sulla microstruttura del sonno.

Le composizioni oggetto della presente invenzione sono caratterizzate da un nucleo interno e da una copertura esterna («corteccia») in un'unica compressa, entrambi contenenti il principio attivo, preferibilmente melatonina, la quale rilascia il principio attivo con una modalità bifasica.

Il contenuto di melatonina può essere compreso fra 0,1 e 100 mg sia nel nucleo interno sia nella «corteccia» esterna, preferibilmente può essere compreso fra 2 e 3 mg nel nucleo interno e fra 0,5 e 1,5 mg nella «corteccia» esterna.

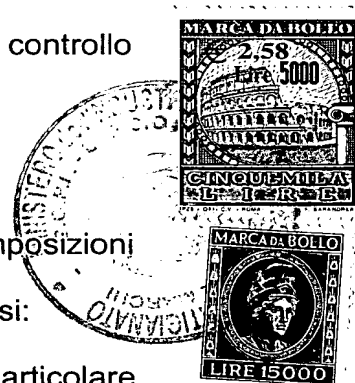
Gli eccipienti impiegati per la preparazione di dette composizioni possono essere tutti quelli normalmente utilizzati nel settore e adatti allo scopo di ottenere il rilascio controllato voluto, ed in particolare tutti quelli ammessi per gli impieghi in campo farmaceutico ed in particolare in campo alimentare e/o dietetico.

Il processo per la preparazione delle composizioni a rilascio controllato contenenti il principio attivo, preferibilmente melatonina, secondo l'invenzione è caratterizzato dalle seguenti fasi:

- a) preparazione del nucleo interno a cessione ritardata contenente il principio attivo, preferibilmente melatonina;
- b) formazione della copertura esterna («corteccia») contenente un ulteriore dosaggio di principio attivo, preferibilmente melatonina, sotto controllo continuo;
- c) fissaggio della copertura esterna.

In particolare il nuovo processo di preparazione di composizioni farmaceutiche a rilascio controllato è caratterizzato dalle seguenti fasi:

- 1) Preparazione della miscela contenente il principio attivo, in particolare melatonina, per la formazione del nucleo a rilascio ritardato con i necessari eccipienti, in particolare eccipienti di volume, eccipienti glidanti e lubrificanti, eccipienti leganti ed eccipienti ritardanti.
- 2) Preparazione del nucleo a durezza predeterminata.
- 3) Preparazione della soluzione di principio attivo, preferibilmente melatonina, per la formazione della «corteccia» delle compresse.
- 4) Applicazione della soluzione contenente il principio attivo alle compresse per la formazione della «corteccia», sotto pressione con controllo

*NP*

continuo della quantità del principio attivo tramite analisi chimica effettuata sui campioni prelevati nel corso della applicazione.

Per detto processo possono essere impiegati tutti gli eccipienti adatti agli scopi della presente invenzione ed in particolare per la fase 1) possono essere impiegati preferibilmente, ad esempio, dicalcio fosfato, mannitolo, lattosio, aerosil, magnesio stearato, polivinilpirrolidone, idrossipropilmetilcellulosa, mentre per la fase 3) possono essere impiegati preferibilmente, ad esempio, idrossipropilmetilcellulosa, lattosio, alcool etilico, acqua depurata.

#### **ESEMPIO 1**

#### **PROCESSO PER LA PREPARAZIONE DELLE COMPRESSE CONTENENTI MELATONINA SECONDO L'INVENZIONE**

E' stata utilizzata melatonina della ditta HELSINN, (Biasca, Svizzera) avente una purezza determinata con HPLC >99.5%. Il resto degli ingredienti è stato fornito da produttori certificati alla produzione e distribuzione di farmaci e/o integratori alimentari.

#### ***Preparazione delle compresse***

Le compresse sono state prodotte in cinque lotti: tre lotti pilota e due lotti sperimentali. I lotti pilota sono stati utilizzati durante la fase dello sviluppo dei lotti sperimentali.

La preparazione è stata condotta attraverso le seguenti fasi successive:

- 1) Preparazione dell'impasto della melatonina per i nuclei con eccipienti di volume, eccipienti glidanti e lubrificanti, eccipienti leganti come ad esempio dicalcio fosfato, mannitolo, lattosio, aerosil, magnesio stearato, polivinilpirrolidone.

Un esempio non limitativo della composizione granulare può essere:

melatonina	2 mg
mannitolo	31 mg
dicalcio fosfato	30 mg
polivinilpirrolidone	4,5 mg
aerosil 200	0.5 mg

2) Granulazione

3) Calibrazione del granulato

4) Aggiunta degli eccipienti ritardanti, lubrificanti, di volume e glidanti come ad esempio idrossipropilmetilcellulosa, lattosio, aerosil, magnesio stearato:

Un esempio non limitativo della composizione unitaria per la formazione dei nuclei può essere:

granulato (da sopra)	68 mg
idrossipropilmetilcellulosa	31 mg
lattosio	75 mg
aerosil 200	0.35 mg
Mg stearato	1.65 mg

5) Formazione dei nuclei a cessione ritardata: compressione controllata in comprimitrice per ottenere durezza dei nuclei pari a 7-8 kN

6) Preparazione della soluzione della melatonina per la «corteccia» delle compresse, contenente i seguenti eccipienti: idrossipropilmetilcellulosa, lattosio, alcool etilico, acqua depurata.

Un esempio non limitativo di composizione della soluzione per la «corteccia» può essere:

melatonina	2.7%
idrossipropilmetilcellulosa	8.8%
lattosio	6.4%
titanio biossido	0.8%
alcool etilico	17.3%
acqua depurata	64%

- 7) Applicazione della soluzione di melatonina sotto pressione alle compresse, per la formazione della «corteccia» con controllo continuo della quantità della melatonina tramite analisi chimica effettuata su campioni prelevati nel corso della fabbricazione.

Le fasi 2), 4), 5) e 7) sono essenziali per la preparazione delle composizioni oggetto dell'invenzione.

## **ESEMPIO 2**

### **TEST *IN VITRO* PER I TEMPI DI CESSIONE DEL PRINCIPIO ATTIVO**

Le compresse preparate, sia nelle prove pilota sia nelle prove sperimentali, come sopra descritto sono state sottoposte ai seguenti test fisico-chimici ai fini di acquisire i seguenti dati:

- a) uniformità del peso;
- b) durezza;
- c) friabilità;
- d) titolo medio della melatonina;
- e) uniformità del contenuto;
- f) disaggregazione;
- g) tempi di cessione del principio attivo.

L'uniformità del peso, la durezza, la friabilità e la disaggregazione sono

stati controllati tramite analisi di routine eseguite secondo procedure standard in uso nel settore. Il titolo medio della melatonina e l'uniformità del contenuto sono state determinate tramite il dosaggio della melatonina nelle compresse.

#### *Dosaggio della melatonina*

I campioni dei lotti pilota sono stati analizzati per il loro contenuto di melatonina tramite metodo radioimmunoanalitico diretto (RIA), utilizzando un anticorpo antimelatonina (Stockgrand LTD) e la 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonina (Amersham International) come marcato. Per ogni determinazione sono stati utilizzate varie quantità di compresse disgregate o del surnatante durante l'incubazione delle compresse *in vitro*. L'analisi RIA è stata condotta in duplicato. Ogni campione è stato incubato per tutta la notte a 4°C in presenza dell'anticorpo e del marcato.

La separazione della melatonina legata dalla melatonina libera è stata effettuata mediante incubazione con "charcoal" destrano e successiva centrifugazione (3000g a 4°C per 20 min). Il surnatante è stato rapidamente eliminato ed il pellet contato con un  $\gamma$ -counter. Il limite inferiore di rilevamento era di 10 pg/ml.

I dati sono stati successivamente confermati tramite analisi HPLC, dei campioni selezionati, in sistema isocratico.

#### *Tempi di cessione del principio attivo*

Le compresse preparate per le prove pilota sono state incubate nel succo gastrico/intestinale a 37°C su vaschetta oscillante ed i campioni sono stati prelevati a tempi prestabiliti: 1, 5, 10, 30 minuti, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 ore. In certi casi i prelievi sono stati effettuati fino all'ottava ora. I campioni sono stati





analizzati per il contenuto in melatonina come descritto sopra.

Sulla base dei dati ottenuti dai lotti pilota sono stati prodotti i lotti sperimentali su cui si è proceduto ad analizzare il contenuto ed a determinare il titolo medio della melatonina, come precedentemente descritto per i lotti pilota. La determinazione della cessione è stata eseguita in sestuplicati per ognuno dei lotti sperimentali (Lotto SP-01: 2 mg + 1 mg; Lotto SP-02: 3 mg + 1 mg).

I dati *in vitro* (analisi HPLC) sono riassunti nelle Tabelle I e II.

#### Tabella I

Tempi di cessione della melatonina dalle compresse 2 + 1 mg.

Tempo	10 min.	1 ora	2 ore	4 ore
Campione	«corteccia» (% del 1 mg)	Nucleo (% dei 2 mg)	Nucleo (% dei 2 mg)	Nucleo (% dei 2 mg)
# 1	104	30	50	77
# 2	107	25	48	80
# 3	105	28	46	79
# 4	108	29	47	76
# 5	103	26	48	80
# 6	109	30	49	76
Media	106	28	48	78

Nota: I dati sono espressi come percentuale di rilascio cumulativo.

**Tabella II**

Tempi di cessione della melatonina dalle compresse 3 + 1 mg.

Tempo	10 min.	1 ora	2 ore	4 ore
Campione	«corteccia» (% del 1 mg)	Nucleo (% dei 3 mg)	Nucleo (% dei 3 mg)	Nucleo (% dei 3 mg)
# 1	95	24	48	87
# 2	98	22	49	83
# 3	96	27	47	84
# 4	97	25	50	85
# 5	99	27	49	86
# 6	97	25	47	85
Media	97	25	48	85

Nota: I dati sono espressi come percentuale di rilascio cumulativo.

Questi risultati di cessione *in vitro* eseguita sui lotti sperimentali concordano con i risultati ottenuti nelle prove pilota e dimostrano che la cessione dalla «corteccia» avveniva entro 10 minuti (95 – 106 % della quantità rilasciata); la cessione dai nuclei avveniva al 78-85% entro quattro ore, il 95% entro la quinta ora dall'inizio dell'incubazione.

Le analisi di laboratorio hanno inoltre confermato l'uniformità del peso; la durezza e friabilità, nella norma da noi prestabilita; il titolo medio della melatonina, omogeneo; il contenuto e la disaggregazione, uniformi.

Sulla base dei dati ottenuti si è proceduto alla sperimentazione nei volontari sani per la determinazione della farmacocinetica della melatonina.

**ESEMPIO 3****FARMACOCINETICA NELL'UOMO (SANGUE E SALIVA: RIA)**

*Materiali e Metodi**Soggetti*

Sei soggetti adulti, 4 maschi e 2 femmine, di età media 35 anni, hanno partecipato alla prova. I volontari sono stati precedentemente informati del significato dello studio ed hanno ricevuto un promemoria sulle modalità di svolgimento. Tutti i soggetti erano sani e non avevano mai sofferto di patologie croniche; nessuno di loro aveva assunto farmaci per le 2 settimane precedenti alla prova e per il periodo dello studio.

I soggetti arruolati hanno assunto una compressa di melatonina (2 mg + 1 mg) alle 8.45 del mattino, in due gruppi da tre soggetti. L'orario di somministrazione è stato scelto in modo tale da non interferire con il normale ritmo di secrezione della melatonina nelle 12 ore seguenti; tutti i volontari sono stati tenuti esposti a luce con intensità > 2000 lux per la durata dell'esperimento.

Nella prima fase la determinazione della farmacocinetica della melatonina dopo la somministrazione orale è stata effettuata mediante la misurazione dei livelli di melatonina sia nel plasma sia nella saliva di 3 dei soggetti, per le 12 ore successive alla somministrazione (tempo 0).

Al momento dell'arrivo, prima della somministrazione della melatonina, la vena antecubitale di tutti i soggetti è stata incannulata con un catetere eparinizzato per effettuare i prelievi di sangue. I prelievi di sangue eparinizzato sono stati immediatamente centrifugati ed il plasma conservato a -20°C fino al giorno dell'analisi. I prelievi di saliva sono stati raccolti mediante appositi tamponi (Salivette, Sarsdet, Germany). I volontari, ai tempi sopra indicati, hanno inserito il tampone nella cavità orale e lo hanno

masticato per 1 min. La saliva è stata successivamente prelevata tramite centrifugazione a 4°C e conservata a -20°C fino al momento dell'analisi.

I prelievi di sangue e di saliva sono stati parallelamente effettuati al tempo 0, 30, 60 e 90 minuti e ad ogni ora per 12 ore a partire dalla seconda ora.

I volontari sono stati istruiti a non bere caffè e a non utilizzare dentifricio per almeno 30 minuti prima di ogni prelievo di saliva.

Nella seconda fase della sperimentazione la farmacocinetica della melatonina è stata determinata nei volontari sani, effettuata mediante la misurazione dei livelli di melatonina solo nella saliva di altri tre soggetti, per le 12 ore successive alla somministrazione (tempo 0). I prelievi di saliva sono stati effettuati come in precedenza al tempo 0, 30, 60 e 90 (minuti) e ad ogni ora per 12 ore a partire dalla seconda ora.

#### *Dosaggio della melatonina in plasma e saliva*

Tutti i campioni di plasma sono stati analizzati per il loro contenuto di melatonina tramite metodo radioimmunoanalitico diretto (RIA), utilizzando un anticorpo anti-melatonina (Stockgrand Ltd) e la 2-[<sup>125</sup>I] iodomelatonina (Amersham International) come marcato.

Per ogni determinazione sono stati utilizzati 200 microlitri di plasma. L'analisi è stata condotta in duplicato. Ogni campione di plasma è stato incubato tutta la notte a 4°C in presenza dell'anticorpo e del marcato. La separazione della melatonina legata dalla melatonina libera è stata effettuata mediante incubazione con "charcoal" destrano e successiva centrifugazione (3000g a 4°C per 20 min.). Il surnatante è stato rapidamente eliminato ed il pellet contato con un  $\gamma$ -counter. Il limite inferiore di determinazione è di 10



*Handwritten signature or initials.*

pg/ml.

L'analisi della melatonina nella saliva è stata effettuata mediante un metodo radioimmunoanalitico diretto (RIA), utilizzando un anticorpo antimelatonina (Stockgrand LTD) e la 2-[<sup>125</sup>I] iodomelatonina (Amersham International) come marcato. Per ogni campione di saliva vengono analizzati 500 microlitri; l'analisi è stata condotta in duplicato. Ogni campione è stato incubato tutta la notte a 4°C in presenza dell'anticorpo e del marcato.

La separazione della melatonina legata dalla melatonina libera è stata effettuata con una separazione in fase liquida, mediante l'utilizzo di un secondo anticorpo anti-IgG e di PEG 6% e successiva incubazione per 4 ore a 4°C.

Dopo centrifugazione a 3000g per 20 min., il surnatante è stato rapidamente eliminato ed il pellet contato con un  $\gamma$ -counter. Il limite inferiore di detectabilità è di 4 pg/ml. I risultati cumulativi sono riportati nella figura 1.

Dai dati ottenuti emergono chiaramente le seguenti conclusioni:

- Il rilevamento della melatonina nella saliva riflette fedelmente la farmacocinetica nel sangue periferico. Tuttavia è da tenere presente che i livelli massimi raggiunti nella saliva sono ritardati nel tempo rispetto a quelli ottenuti nel sangue: un fenomeno chiaramente dovuto al trasporto della melatonina dal sangue alle ghiandole salivari e quindi nella saliva.
- La formulazione a rilascio controllato 1 mg + 2 mg è adatta alla somministrazione nell'uomo, in quanto si ottengono nell'organismo bassi livelli farmacologici (200 – 1500 pg/ml) per un tempo di 6-7 ore.
- La formulazione a rilascio controllato 1 mg + 2 mg risulta in livelli della melatonina nel sangue periferico con un "pattern" molto simile a quello

naturale della melatonina durante la notte.

- La formulazione a rilascio controllato 1 mg + 2 mg risulta adatta agli interventi sull'induzione del sonno, in quanto livelli della melatonina superiori ad 1000 pg/ml vengono ottenuti nel sangue periferico entro 30 minuti dalla somministrazione.
- La formulazione a rilascio controllato 1 mg + 2 mg risulta adatta agli interventi sul sostentamento del sonno indotto, in quanto livelli della melatonina tra 250 e 1000 pg/ml vengono mantenuti nel sangue periferico per circa 6 ore dopo la somministrazione.

Dati paragonabili dal punto di vista cinetico sono stati ottenuti con la somministrazione della melatonina nella formulazione 1 mg + 3 mg, chiaramente dimostrando che l'invenzione possa essere utilizzata con diverse quantità del composto attivo.

#### **Esempio 4**

##### **EFFETTI SUL SONNO NELL'UOMO**

###### *Materiali e Metodi*

###### *Soggetti e trattamento*

Dieci pazienti (età media  $56 \pm 3.6$  anni) sofferenti da insonnia psicofisiologica sono stati arruolati nello studio. Tutti sono stati classificati secondo The International Classification of Sleep Disorders, Revised Edition, ASDA, 1997. Tutti sono stati informati e hanno dato consenso verbale per partecipare allo studio. Tutti hanno ricevuto delle cartelle contenenti dei moduli prestampati da compilare per dieci giorni i seguenti parametri: Tempo totale del sonno (TST), Latenza del sonno (SL), Tempo trascorso svegli dopo essersi addormentati (WASO), Numero di risvegli (NA).

Il trattamento è durato una settimana. Nei tre giorni precedenti il trattamento con le composizioni a rilascio controllato contenenti melatonina secondo la presente invenzione (1 + 2 mg di melatonina), i soggetti hanno assunto composizioni standard di melatonina in compresse da 3 mg. Entrambi, i trattamenti avvenivano alle 22.30 h. In seguito, sulla base dei dati raccolti, è stata calcolata l'efficienza del sonno.

### *Risultati*

I risultati sono riassunti nella tabella III.

TST, SL e WASO sono espressi in minuti. NA è il valore numerico dei risvegli. SE è il calcolo percentuale del tempo trascorso nel sonno sottraendo il tempo trascorso da svegli dopo l'inizio del sonno.

**Tabella III**

Parametro	Baseline	Melatonina normale	Melatonina invenzione
TST	270 ± 24	290 ± 18 <sup>a</sup>	330 ± 34 <sup>a,b</sup>
SL	55 ± 7.5	38 ± 5.6 <sup>a</sup>	34 ± 8.3 <sup>a,b</sup>
WASO	42.2 ± 23.1	44.2 ± 19.4	27.3 ± 10.2 <sup>a,b</sup>
NA	6.2 ± 2.4	7.5 ± 2.7	4.3 ± 1.6 <sup>a,b</sup>
SE (%)	84.3	84.7	91.7 <sup>a,b</sup>

*a* = significativamente diverso dal Baseline.

*b* = significativamente diverso dalla Melatonina normale.

Dai dati sopra riportati si evince chiaramente che le composizioni standard di melatonina, anche se diminuiscono la latenza del sonno (SL) ed influenzano TST in modo marginale, non hanno effetti significativi sulla SE, in quanto non riducono WASO e NA.

Contrariamente, le composizioni a rilascio controllato contenenti melatonina secondo la presente invenzione, nello stesso dosaggio, migliorano tutti i parametri del sonno: TST, SL WASO, NA, e di conseguenza SE.

Sono da considerare estremamente importanti nell'ambito della presente invenzione i dati sul WASO e NA, per la loro importanza sulla qualità del sonno, evidentemente dovuti all'effetto di rilascio controllato della melatonina.

La presente invenzione presenta i seguenti vantaggi di fronte alle soluzioni fino ad oggi adottate:

- a) vengono utilizzati solo composti naturali, ammessi nell'alimentazione umana, in opposizione ai composti chimici di origine sintetica impiegati nelle forme *retard* o di rilascio controllato esistenti;
- b) la formulazione è semplice e poco costosa;
- c) la formulazione consiste di una unica compressa di piccole dimensioni (6 mm diametro) e questo migliora il *compliance* del paziente;
- d) la composizione qualitativa è riproducibile in condizioni industriali (due lotti sono stati prodotti indipendentemente dalle prove pilota);
- e) la formulazione è molto efficace e permette il completo rilascio dei principi attivi nei tempi prevedibili.

Le composizioni secondo questa invenzione possono essere utilizzate anche per la preparazione di integratori alimentari o alimenti, o prodotti erboristici, ovvero sia preparati che nell'ambito di una alimentazione globalmente controllata possono integrare la dieta in soggetti che presentano carenze intra e extracellulari dei detti componenti





e quindi con alterati processi metabolici.

Le composizioni secondo la presente invenzione possono contenere come principi attivi anche delle vitamine o minerali o amminoacidi o acidi grassi o antiossidanti o estratti vegetali o estratti animali, o altri nutrienti o alimenti che, nell'ambito di una alimentazione globalmente controllata, possono integrare la dieta in soggetti che presentano carenze intra e extracellulari dei detti componenti e quindi con alterati processi metabolici.

## RIVENDICAZIONI

1. Composizioni a rilascio controllato contenenti melatonina, caratterizzate dal fatto di essere formate da un nucleo interno a rilascio lento e da una «corteccia» esterna a rilascio veloce, entrambi contenenti melatonina, a dosaggi uguali o diversi.
2. Composizioni secondo la rivendicazione 1, caratterizzate dal fatto che il contenuto di melatonina può essere compreso fra 0,1 e 100 mg sia nel nucleo interno sia nella «corteccia» esterna.
3. Composizioni secondo la rivendicazione 2, caratterizzate dal fatto che la «corteccia» a rilascio veloce contiene il principio attivo preferibilmente in quantità di 1 mg ed il nucleo a rilascio lento contiene il principio attivo preferibilmente in quantità compresa tra 2 e 3 mg.
4. Processo per la preparazione di composizioni a rilascio controllato, caratterizzato dal fatto che viene preparato un nucleo interno e una «corteccia» esterna, entrambi contenenti un principio attivo, in grado di rilasciare il principio attivo con una modalità bifasica ed in particolare caratterizzato dalle seguenti fasi : a) preparazione dei nuclei a cessione ritardata contenenti il principio attivo; b) formazione della «corteccia» contenente il principio attivo sotto controllo continuo; c) fissaggio di detta «corteccia».
5. Processo secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che le composizioni sono le composizioni secondo le rivendicazioni da 1 a 3.
6. Processo secondo la rivendicazione 4 o 5, caratterizzato dal fatto che la fase a) è composta da:
  - preparazione della miscela del principio attivo, per la formazione dei

nuclei a rilascio lento, con eccipienti di volume, eccipienti glidanti e lubrificanti, eccipienti leganti ed eccipienti ritardanti;

- preparazione dei nuclei a rilascio lento.
7. Processo secondo la rivendicazione 6, in cui per la preparazione dei nuclei interni contenenti il principio attivo, gli eccipienti di volume, eccipienti glidanti e lubrificanti, eccipienti leganti ed eccipienti ritardanti preferenziali possono essere dicalcio fosfato, mannitolo, lattosio, aerosil, magnesio stearato, polivinilpirrolidone, idrossipropilcellulosa;
8. Processo secondo la rivendicazione 6, caratterizzata dal fatto che la preparazione dei nuclei interni è composta da:
- granulazione
  - calibrazione del granulato
  - compressione controllata
9. Processo secondo la rivendicazione 8, caratterizzata dal fatto che si ottengono preferibilmente nuclei di durezza pari a 7-8 kN;
10. Processo secondo la rivendicazione 4 o 5, caratterizzato dal fatto che la fase b) è composta da:
- preparazione della soluzione contenente il principio attivo;
  - applicazione della soluzione sotto pressione.
11. Processo secondo la rivendicazione 10, caratterizzata dal fatto che per la preparazione della soluzione del principio attivo gli eccipienti preferenziali possono essere scelti tra idrossipropilmetilcellulosa, lattosio, alcool etilico, acqua depurata.
12. Processo secondo la rivendicazione 11, caratterizzato dal fatto di applicare la soluzione del principio attivo sotto pressione con controllo

continuo della quantità del principio attivo tramite analisi chimica effettuata su campioni prelevati nel corso della applicazione.

13. Uso delle composizioni secondo le rivendicazioni da 1 a 3 per la preparazione di farmaci per il trattamento di disturbi del sonno.
14. Uso delle composizioni secondo le rivendicazioni da 1 a 3 per la preparazione di integratori dietetici o alimentari per il trattamento o come coadiuvante nei disturbi del sonno.

(SL/pd)

Milano, li 17 Maggio 2000

p. AMBROS PHARMA S.r.l.

Il Mandatario



Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



*[Handwritten signature]*

Figura 1

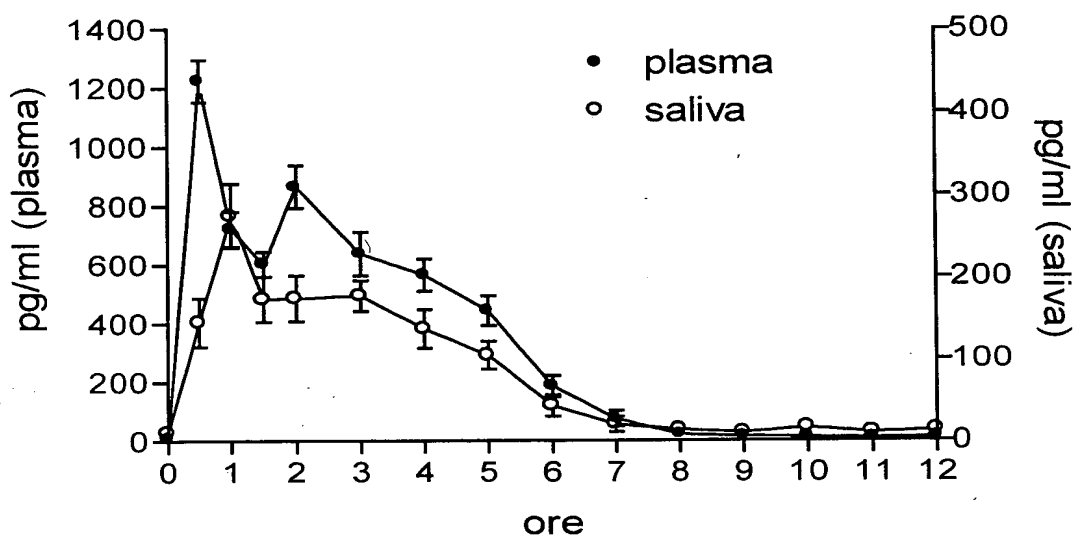


Figura 1: Livelli (Media  $\pm$  SD) della melatonina nel plasma e nella saliva dei volontari sani dopo somministrazione della melatonina a rilascio controllato (1 + 2 mg).

